

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑰ Anmeldenummer: 85109427.6

① Int. Cl.⁴: **C 12 Q 1/18**

C 12 Q 1/04, C 12 Q 1/34

C 12 Q 1/54

⑱ Anmeldetag: 23.07.86

⑳ Priorität: 14.08.84 DE 3429823

㉑ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
19.03.86 Patentblatt 86/12

㉒ Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE FR GB IT LI NL SE

㉓ Anmelder: Merck Patent Gesellschaft mit beschränkter
Haftung
Frankfurter Strasse 250
D-6100 Darmstadt(DE)

㉔ Erfinder: Kappner, Manfred, Dr.
Lärchenweg 11
D-6110 Dieburg(DE)

㉕ Erfinder: Metz, Harald, Dr.
Am Landbach 8
D-6101 Bickenbach(DE)

㉖ Mittel und Verfahren zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen.

㉗ Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum Nachweis von antimikrobiell wirksamen Substanzen in einer Probe. Das Mittel besteht aus Mikroorganismensporen, einem Nährmedium, einem Indikator, einem Puffersystem und gegebenenfalls einem Detergenz. Es ist dadurch gekennzeichnet, daß der Indikator ein chromogenes oder fluorogenes Enzymsubstrat für Hydrolasen ist.

EP 0 174 477 A1

5 Mittel und Verfahren zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen

Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum einfachen und schnellen Nachweis von antimikrobiell wirksamen Substanzen in flüssigen Proben oder in in geeigneten Flüssigkeiten suspendierten festen Proben.

- 10 Die Bedeutung von Antibiotikarückständen in Lebensmitteln tierischer und pflanzlicher Herkunft liegt in der Verursachung von wirtschaftlichen Schäden bei der technologischen Verarbeitung bzw. im potentiellen gesundheitlichen Risiko für den Konsumenten. Die Schäden bei der
- 15 Verarbeitung Antibiotika enthaltender Lebensmittel, z. B. bei der Sauermilch-, Joghurt-, Käseproduktion oder auch bei der Rohwurstherstellung beruhen darauf, daß die Aktivität der für die Herstellung fermentierter Produkte essentiellen Mikroorganismen gehemmt wird, so daß Fehlproduktionen oder Produkte mit deutlichen Qualitätsmängeln entstehen. Der regelmäßige Genuß Antibiotika enthaltender
- 20 Nahrungsmittel birgt für die menschliche Gesundheit zahlreiche Gefahren, z.B. toxische Schädigung, Allergien, Resistenzbildung apathogener und pathogener Darmbakterien.
- 25 Für die medizinische Diagnostik sind Informationen über Antibiotikaspiegel in Körperflüssigkeiten, wie Urin, Liquor oder Blut, von großer Bedeutung zur verlässlichen Befunderstellung und Therapiesteuerung. Unter Chemotherapie sind die Antibiotikawirkstoffspiegel im Urin, verglichen mit den Gewebespiegeln, häufig sehr hoch. Eine mikrobiologische Keimzahluntersuchung des Urins ist deshalb
- 30

unbedingt durch eine Prüfung auf antimikrobielle Aktivität zu ergänzen.

Der Nachweis von antimikrobiellen Substanzen kann nach verschiedenen physikalischen, chemischen, biochemischen und mikrobiologischen Verfahren erfolgen. Der chemische und physikalische Nachweis bestimmter mikrobieller Hemmstoffe erfolgt über die Identifizierung einer charakteristischen Komponente, wie z. B. der Guanidinogruppe im Streptomycin, des Chlors im Chloramphenicol oder durch Feststellung bestimmter Absorptionsmaxima. Immunologische Methoden (Radioimmunassay, Enzymimmunassay) eignen sich ebenfalls zum gezielten Nachweis bestimmter Antibiotika. Für Reihenuntersuchungen von Proben auf antimikrobiell wirksame Substanzen sind die chemischen, physikalischen und immunologischen Methoden jedoch meist ungeeignet, weil sie in einem Untersuchungsgang nur den Nachweis einer chemisch definierten Verbindung oder einer bestimmten Gruppe von chemisch definierten Verbindungen ermöglichen.

Mikrobiologische Testverfahren dagegen ermöglichen je nach Hemmstoffempfindlichkeit des Testorganismus eine Erfassung vieler antimikrobieller Substanzen. Eine einfache und rasche Identifizierung der antimikrobiellen Substanzen ist jedoch mit Ausnahme β -Lactamase-empfindlicher β -Lactamantibiotika bisher nicht möglich.

Das Prinzip des mikrobiologischen Hemmstofftests beruht darauf, daß ein hemmstoffempfindlicher Mikroorganismus parallel in einem hemmstofffreien und potentiell hemmstoffhaltigen Nährmedium gezüchtet wird und daß irgendeine Lebensäußerung des Keimes gemessen wird; eine auftretende Differenz in den beiden Proben deutet auf die Anwesenheit von Hemmstoffen hin. Die wichtigsten in der Praxis verwendeten Testkeime sind *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Sarcina lutea* sowie *Streptococcus thermophilus*.

0174477

Mit einem einzigen Testorganismus, z. B. *Bacillus subtilis*, sind nicht alle antibakteriell wirksamen Substanzen gleich gut nachweisbar, da die Empfindlichkeit der Testorganismen gegenüber den verschiedenen Antibiotika unterschiedlich ist.

- 5 Mit den erwähnten *Bacillus*-arten kann ein Großteil der therapeutisch interessanten Antibiotika gut nachgewiesen werden. Zum Nachweis bestimmter Antibiotika ist der am besten geeignete Testorganismus anhand der Antibiotikaempfindlichkeit auszuwählen. Für spezielle Problemstellungen, wie den Nach-
- 10 weis von Antibiotika in Rohstoffen für Fermentationsprozesse, ist es zur Vermeidung von Fehlchargen sinnvoll, den Rückstandstest direkt mit den Produktionsstämmen durchzuführen (z. B. Joghurt-Bakterien bei der Joghurt-Produktion).

- 15 Die Fähigkeit zur Endosporenbildung sowie die hohe Empfindlichkeit der oben erwähnten *Bacillus*-arten gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen während der Auskeimphase bzw. vegetativen Phase macht diese Bakterien zu den bevorzugten Testorganismen.

- 20 Gebräuchliche mikrobiologische Testverfahren sind z. B. Agardiffusionstests, turbidimetrische Methoden, Bestimmung von pH- oder potentiometrischen Änderungen oder radiometrische Methoden. Beim Agardiffusionsverfahren bringt man Proben des hemmstoffverdächtigen Materials auf einen festen, mit dem Testkeim beimpften Agarnährboden aus.
- 25 Vorhandene Hemmstoffe diffundieren von der festen Originalprobe (z. B. Fleischstückchen) bzw. von dem mit der flüssigen Probe (z. B. Milch, Urin) getränkten Filterpapierblättchen in den Agar und verursachen auf dem nach Bebrütung dicht bewachsenen Nährboden organismenfreie
- 30 "Hemmhöfe". Optimierte Agardiffusionstests mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testorganismus benötigten Analysenzeiten von lediglich 2 - 4 Stunden. Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Testplatten beträgt jedoch selbst unter optimalen Lagerungsbedingungen nur we-

nige Wochen; die Herstellung der Testplatten ist sehr zeitaufwendig und damit kostenintensiv.

- Bei den turbidimetrischen Methoden wird das Wachstum des Testorganismus in einem hemmstofffreien und potentiell hemmstoffhaltigen Nährmedium anhand der durch das Wachstum des Testorganismus bedingten Trübungsänderung gemessen. Radiometrische Verfahren zur Hemmstoffprüfung basieren auf einer Wachstumsprüfung der Testkeime in einem Nährmedium mit C-14-markierter Glucose.
- 5
- 10 Ein Schnelltestverfahren zum Nachweis von β -Lactam-Antibiotika in einer Probe beruht z. B. auf der Hemmung der Enzymaktivität der D-Alanyl-D-alanin-carboxypeptidase durch stöchiometrische Komplexbildung mit β -Lactam-Antibiotika (EP-OS 85 667).
- 15 Die direkte Bestimmung von Enzymaktivitäten von Mikroorganismen mit Hilfe chromogener oder fluorogener Substrate zur Empfindlichkeitsprüfung gegen Antibiotika ist z. B. aus EP-OS 91 837, EP-OS 54 001 und US 3509 026 bekannt. Auch ist z. B. aus DE-OS 29 30 394 bekannt, daß Antibiotika durch
- 20 Messung der intrazellulären ATP-Konzentration der Testorganismen nach bestimmten Inkubationszeiten erfaßt werden können.

- Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und ein Testsystem auf antimikrobiell wirksame Substanzen zur Verfügung zu stellen, das die folgenden Anforderungen erfüllt:
- 25

ein zuverlässiges Analysenergebnis in wenigen Stunden,
eine sichere Einsatzmöglichkeit auch bei schwach keimhaltigen Proben ohne vorherige Sterilisation der Proben,

- eine Unempfindlichkeit des Testsystems gegenüber nicht antimikrobiell wirksamen Substanzen in der Probe,
eine gute Nachweisempfindlichkeit für die Mehrzahl der in der Praxis eingesetzten Antibiotika,
5 eine Testdurchführung ohne großen Arbeits- und Materialaufwand,
die Eignung für Reihenuntersuchungen,
eine Haltbarkeit des gebrauchsfertigen Testsystems von mehreren Monaten,
10 eine preisgünstige kommerzielle Herstellung und die Möglichkeit zur einfachen Automatisierung.

- Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß das erfindungsgemäße Mittel und Verfahren zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen im Gegensatz zu den bekannten Verfahren alle oben aufgeführten Anforderungen erfüllt.
15

- Gegenstand der Erfindung ist ein Mittel zum Nachweis von antimikrobiell wirksamen Substanzen in einer Probe, bestehend aus Mikroorganismensporen, einem Nährmedium, einem Indikator, einem Puffersystem und gegebenenfalls
20 einem Detergenz, das dadurch gekennzeichnet ist, daß der Indikator ein chromogenes oder fluorogenes Enzymsubstrat für Hydrolasen ist.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von antimikrobiell wirksamen Substanzen in
25 einer Probe, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein aus Mikroorganismensporen, einem Nährmedium, einem chromogenen oder fluorogenen Enzymsubstrat für Hydrolasen, einem Puffersystem und gegebenenfalls einem Detergenz bestehendes Testsystem mit der Probe vereinigt, inkubiert und das
30 entstandene Chromophor oder Fluorophor visuell oder photometrisch bestimmt.

Das erfindungsgemäße Mittel und Verfahren ermöglicht eine Prüfung von Proben auf antimikrobiell wirksame Substanzen - je nach Art des Testkeims - in längstens 6 Stunden durch den direkten und spezifischen Nachweis bestimmter Hydro-
5 laseaktivitäten der hemmstoffempfindlichen Testorganismen gegenüber chromogenen oder fluorogenen Enzymsubstraten.

Als chromogene oder fluorogene Enzymsubstrate für Hydrolasen kommen Glycoside, Carbonsäureester und Peptid-
10 Derivate infrage, die ein Chromophor oder Fluorophor im Molekül enthalten, das unter den Bedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens abgespalten werden kann. Bevorzugte Fluorogene sind z.B. die aus dem Stand der Technik bekannten Derivate von 4-Methyl-umbelliferon,
15 7-Amino-4-methyl-cumarin, Fluorescein, α - und β -Naphthol, α - und β -Naphthylamin. Bevorzugte Chromogene sind z.B. die Derivate von Nitroanilin, Nitrophenol, diazotierte Naphthole oder Naphthylamine und Derivate des Indigo.
20 Die chromogenen oder fluorogenen Enzymsubstrate werden in Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^{-5} M, vorzugsweise von 10^{-2} bis 10^{-3} M, bezogen auf die Endkonzentration im Bebrütungsansatz, eingesetzt.

Bei den Hydrolasen, die die enzymatische Abspaltung
25 des Chromophors oder Fluorophors bewirken, und die zum Nachweis der Stoffwechselaktivität der Testorganismen dienen, handelt es sich um Esterasen für aliphatische Carbonsäureester ($C_2 - C_{26}$), Glycosidasen wie α -D-Glucosidase, β -D-Glucosidase, α -D-Galactosidase,
30 β -D-Xylosidase sowie um Aminopeptidasen wie D-Alanin-Aminopeptidase, L-Pyroglutaminsäure-Aminopeptidase, Glycin-Aminopeptidase oder L-Arginin-Aminopeptidase.

Die für den Hemmstofftest vorzugsweise eingesetzten *Bacillus*-arten zeichnen sich durch sehr gute Esteraseaktivitäten für aliphatische Carbonsäureester mit beispielsweise 4-Methylumbelliferon als Fluorophor aus.

- 5 *Bacillus subtilis* zeigt z. B. hervorragende Esteraseaktivitäten für folgende fluorogene Substrate: 4-Methylumbelliferyl-acetat, Fluorescein-di-acetat, 4-Methylumbelliferyl-propionat, 4-Methylumbelliferyl-butyrate, 4-Methylumbelliferyl-i-butyrate, 4-Methylumbelliferyl-valerianat, 4-Methylumbelliferyl-i-valerianat, 4-Methylumbelliferyl-trimethylacetat, 4-Methylumbelliferylcaproat, 4-Methylumbelliferylheptanoat, 4-Methylumbelliferylcaprylat, 4-Methylumbelliferyl-nonanoat, 4-Methylumbelliferylcaprinat, 4-Methylumbelliferyl-laurat, 4-Methylumbelliferyl-myristat, 4-Methylumbelliferyl-palmitat, 4-Methylumbelliferyl-oleat, 4-Methylumbelliferyl-elaidat, 4-Methylumbelliferyl-stearat, 4-Methylumbelliferyl-lignocerot.

- Während die Mehrheit der Esteraseaktivitäten für die verschiedenen Substrate nicht spezifisch nur bei den erwähnten *Bacillus*-Testorganismen vorkommt - die Testorganismen zeichnen sich lediglich durch besonders hohe Enzymaktivitäten aus - besitzen einige Glycosidasen, vor allem die α -D-Glucosidase, eine hohe Spezifität für *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* sowie *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Bei der Mehrzahl der gramnegativen und grampositiven Bakterien können unter den Testbedingungen keine oder nur geringe α -D-Glucosidase-Aktivitäten nachgewiesen werden. Die α -D-Glucosidase eignet sich somit in Hemmstofftests gut zum Nachweis der Stoffwechselaktivitäten von *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* oder *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*,

auch in Proben, die hemmstoffresistente Bakterien enthalten. *Bacillus subtilis* besitzt weiterhin gute β -D-Glucosidase- sowie α -D-Galactosidase-Aktivitäten. *Bacillus stearothermophilus* zeigt ebenfalls eine gute α -D-Galactosidase-Aktivität.

Enthält das erfindungsgemäße Mittel Sporen von *Bacillus subtilis*, so wird als chromogenes oder fluorogenes Substrat für Glycosidasen vorzugsweise ein β -D-Glucosid oder ein α -D-Glucosid eingesetzt und für Aminopeptidasen eine D-Alanin-(Chromophor/Fluorophor)-Verbindung oder ein D-Alanin-(Chromophor/Fluorophor) enthaltendes Peptid. Enthält das erfindungsgemäße Mittel Sporen von *Bacillus stearothermophilus*, so wird als chromogenes oder fluorogenes Substrat vorzugsweise ein α -D-Glucosid oder ein α -D-Galactosid eingesetzt.

Als Substrat für die α -D-Glucosidase kann beispielsweise p-Nitrophenyl- α -D-glucosid, 4-Methylumbelliferyl- α -D-glucosid, Fluorescein- α -D-glucosid, α - bzw. β -Naphthyl- α -D-glucosid, Indoxyl- α -D-glucosid, 5-Brom-3-indoxyl- α -D-glucosid, 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- α -D-glucosid und Indoxyl- α -D-glucosid-pentaacetat verwendet werden.

Bacillus subtilis zeigt unter den Testbedingungen eine deutliche und organismenspezifische D-Alanin-Aminopeptidase-Aktivität bei D-Alanin-7-amido-4-methylcumarin als fluorogenem Substrat bzw. D-Alanin-p-nitroanilin als chromogenem Substrat. Weitere geeignete Substrate sind Peptid-Derivate, die am N-terminalen Ende der Verbindung D-Alanin-(Chromophor/Fluorophor) weitere Aminosäuren wie Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure usw. enthalten, z. B. Glycyl-D-alanin-7-amido-4-methylcumarin.

- Als Testorganismen für antimikrobiell wirksame Substanzen werden vorzugsweise Sporen von *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* oder *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* in einer Konzentration von 10^4 - 10^9 Sporen pro Inkubationsansatz verwendet. Alternativ zu den Bakteriensporen zum Nachweis von antibakteriell wirksamen Substanzen können auch Pilzsporen zum Nachweis von Antimycotika eingesetzt werden. Geeignete Testorganismen für antimykotische Substanzen sind bei den Dermatophyten z. B. *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton schoenleinii*, bei den pathogenen Hefen *Candida albicans* und *Torulopsis glabrata*. Für den allgemeinen Nachweis von Antimycotika können *Aspergillus* oder *Penicillium*-Arten verwendet werden.
- Als Nährmedium kann z. B. MUELLER-HINTON-Bouillon, Hirn-Herz-Bouillon, Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon in geeigneten Puffern wie Phosphatpuffer, Tris/HCl-Puffer oder anderen gebräuchlichen Puffersystemen eingesetzt werden. Ein bevorzugter Puffer ist 0,1 M Kaliumphosphatpuffer. Die Wahl des Puffers sowie des pH-Wertes richtet sich sowohl nach den optimalen Testbedingungen des nachzuweisenden Enzyms als auch nach den geeignetsten physiologischen Bedingungen für die Testorganismen. Der Fachmann kann die geeignetsten Bedingungen nach Routinemethoden ermitteln.
- Durch Zusatz eines Detergenz zum Testansatz in Konzentrationen, die keinen negativen Effekt auf das Wachstum der Bakterien besitzen, kann bei Antibiotika mit Primärwirkort in der Mureinbiosynthese die Nachweisempfindlichkeit verbessert werden. Zellen mit gestörter Mureinbiosynthese platzen in Gegenwart von Detergenz und bilden keine large-Formen, die bei der Enzymaktivitätsbestimmung ein normales ungehemmtes Wachstum der Testorganismen vortäuschen. Deter-

genzien werden vorzugsweise in Konzentrationen von 10^{-4} - 10^{-6} M, bezogen auf die beabsichtigte Endkonzentration, zugesetzt. Vorzugsweise enthält das Mittel nach der Erfindung kationenaktive, anionenaktive und/oder nichtionogene Detergenzien wie Polyoxyethylenderivate der Sorbitanester wie

5 Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, -sorbitanmonopalmitat und -sorbitanmonooleat.

Glucosekonzentrationen in Testansätzen von mehr als 1 g/l führen teilweise zur Reprimierung der Glycosidasen. Durch

10 Oxidation der Glucose kann dieser "Glucoseeffekt" aufgehoben werden.

Aus der Vielzahl der antimikrobiell wirksamen Substanzen, die mit dem erfindungsgemäßen Mittel und Verfahren nachgewiesen werden können, seien z. B. die folgenden genannten:

15 Aminoglycosid-Antibiotika wie Streptomycin, Neomycin, Kanamycin, Gentamycin, Spectinomycin; Chloramphenicol und -Derivate wie Thiamphenicol; Makrolid-Antibiotika wie Erythromycin, Leucomycin, Oleandomycin, Spiramycin, Carbomycin; Lincomycine wie Clindamycin, Lincomycin;

20 Penicilline wie Phenoxymethylpenicillin, Ampicillin, Penicillin G, Penicillin V, Dicloxacillin-Natrium, Furoxaccillin, Mecillinam; Cephalosporine wie Cefalothin, Cefamandol, Cefazedon, Cefazolin, Cefoxitin, Cefuroxim; Peptid-Antibiotika wie Bacitracin, Gramicidin, Polymyxine;

25 Rifamycine wie Rifampicin, Rifamycin; Steroid-Antibiotika wie Fusidinsäure; Tetracycline wie Doxycyclin, Minocyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin; sowie sonstige Antibiotika z. B. Cycloserin, Fosfomycin, Vancomycin, Sulfonamide, Nitrafurantoin, Nalidixinsäure.

30 Die Nachweisempfindlichkeit für die verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen ist von der Hemmstoffempfindlichkeit der verwendeten Testorganismen, der Anzahl der Testorganismen im Inkubationsansatz sowie der Nährmedium-

zusammensetzung abhängig und entspricht mindestens derjenigen der bekannten Hemmstofftests. Der Arbeitsaufwand zur Durchführung des Tests auf antimikrobiell wirksame Substanzen ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren auf ein
5 Minimum reduziert. Da die Komponenten des gebrauchsfertigen Testansatzes in getrockneter Form vorliegen, ist eine ausreichende Haltbarkeit von mindestens mehreren Monaten gewährleistet.

Die Durchführung des Tests auf antimikrobiell wirksame
10 Substanzen ist sehr einfach: die flüssige Probe oder die in einer geeigneten Flüssigkeit suspendierte feste Probe wird in ein Reaktionsfeld des gebrauchsfertigen Testansatzes gegeben, anschließend wird das Testsystem bei der optimalen Wachstumstemperatur des Testorganismus bebrütet.
15 Bei *Bacillus subtilis*-Sporen als Testorganismen beispielsweise ist in Abhängigkeit von der Auskeimungsgeschwindigkeit der Sporen meist nach einer Bebrütungszeit von 4 Stunden bei der optimalen Wachstumstemperatur des Testorganismus eine sichere Aussage über das Vorliegen von antimikrobiell wirksamen Substanzen in der Probe durch Bestimmung der Konzentration des hydrolytisch gespaltenen Anteils des chromogenen bzw. fluorogenen Enzymsubstrats möglich. Der Test kann zuverlässig mit bloßem Auge durch Vergleich der Farbintensität des Chromophors oder der
20 Fluoreszenzintensität des Fluorophors im Testansatz mit Standards ausgewertet werden. Bei Konzentrationen von antimikrobiell wirksamen Substanzen, die größer oder gleich der minimalen Hemmkonzentration sind, werden im Vergleich zur hemmstofffreien Probe keine oder nur minimale Konzentrationen des Enzymsubstrates hydrolytisch gespalten.
25
30

Der gebrauchsfertige, in trockener Form vorliegende Testansatz des Testsystems hat folgende Zusammensetzung:
Keime des Testorganismus (vorz. Sporen), ein Nährmedium, ein chromogenes oder fluorogenes Enzymsubstrat für Hydrolasen,

ein geeignetes Puffersystem und ggf. ein Detergenz. Der Testansatz kann jedoch auch Bestandteile zur Beseitigung störender Substanzen enthalten, z. B. ein Enzym zur Oxidation von Glucose.

- 5 Das Testsystem besteht wahlweise aus einem Tiefziehteil bzw. einem Spritzgußteil mit zahlreichen, 0,5 bis 1 ml großen Kavitäten oder aus einer handelsüblichen Mikrotiterplatte. Zur Vermeidung von Flüssigkeitsverlust bei der Bebrütung können die Kavitäten des Testsystems mit einer Haft- oder
- 10 Klebefolie bzw. einem Deckel verschlossen werden. Die Komponenten des gebrauchsfertigen Testansatzes, die in getrockneter Form vorliegen, können in den Kavitäten auch auf Trägern mit einer guten Aufnahmefähigkeit für Flüssigkeiten aufgebracht sein (z. B. Filterpapierblättchen).
- 15 Alternativ können die Komponenten des gebrauchsfertigen Testansatzes auch auf Reaktionszonen von Teststäbchen mit einer guten Aufnahmefähigkeit von Flüssigkeiten aufgebracht werden. Die Probe kann entweder auf eine oder mehrere Reaktionszonen des Teststreifens, die eine definierte Auf-
- 20 nahmefähigkeit für Flüssigkeiten besitzen, nach dem Eintauchverfahren aufgebracht werden, oder es wird eine definierte Probenmenge mit einer Pipette auf die Reaktionszone aufgetragen. Die Zusammensetzung des gebrauchsfertigen Testansatzes kann auf einzelnen Reaktionszonen verschieden
- 25 sein; es können z. B. pH-Wert, Puffersystem, Enzymsubstrate, Testorganismen, Nährmedium sowie Art und Konzentration des Detergenz variiert werden.

- Die Reaktionszone auf dem Teststreifen kann z. B. aus speziellen Filterpapieren und/oder einer polymeren Matrix
- 30 aus z. B. Carboxymethylcellulose, Calciumalginat, Polyvinylalkoholen, Polyvinylpyrrolidon bestehen. Die Test-

organismen können auch trägerfixiert vorliegen. Zur Verhinderung des Austrocknens bei der Bebrütung werden die Teststreifen in entsprechenden, in der Form angepaßten und dicht verschließbaren Bebrütungsgefäßen aufbewahrt.

- 5 Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Hemmstofftest unter Nachweis der α -D-Glucosidase von *Bacillus stearothermophilus*

- 10 Herstellung des gebrauchsfertigen Testsystems
50 μ l einer 10fach konzentrierten MUELLER-HINTON-Bouillon in 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,5, 50 μ l einer 10^{-2} M wäßrigen Lösung von p-Nitrophenyl- α -D-glucosid sowie 10 μ l einer $5 \cdot 10^{-4}$ M Lösung von Polyethylenglycol-mono[p-(1.1.3.3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether werden in eine 1-ml-Poly-
15 styrolküvette gegeben. Die Lösung wird anschließend gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird mit 10 μ l einer wäßrigen Sporensuspension von *Bacillus stearothermophilus* (KUNDRAT) mit $5 \cdot 10^7$ Sporen/ml versetzt und anschließend
20 erneut lyophilisiert. Nach der Lyophilisation wird die gebrauchsfertige Testküvette mit einem Deckel verschlossen, in einen Beutel aus aluminiumkaschierter Polyethylenfolie eingeschweißt und bis zum Gebrauch bei 4 - 6 °C kühl gelagert.

- 25 Durchführung des Hemmstofftests

Jeweils 0,5 ml einer wäßrigen Probenlösung mit 0/0,5/0,1/0,05/0,01/0,005/0,001/0,0005 μ g/ml Phenoxymethylpenicillin werden in je eine gebrauchsfertige Testküvette gegeben.

Die Küvetten werden verschlossen und 4 Stunden bei 60 °C bebrütet. Anschließend wird nach Zugabe von 50 µl 1 N Natronlauge die Extinktion des Testansatzes bei 390 nm bestimmt.

- 5 Die Probe ohne Phenoxymethylpenicillin bzw. mit 0,001 sowie 0,0005 µg/ml Phenoxymethylpenicillin zeigt eine deutlich höhere Extinktion bei 390 nm als die Proben mit 0,005 µg/ml oder einer höheren Phenoxymethylpenicillin-Konzentration.

- Die Nachweisgrenze von Phenoxymethylpenicillin beträgt
10 somit unter den gewählten Testbedingungen 0,005 µg/ml.

Beispiel 2

Hemmstofftest unter Nachweis der β -D-Glucosidase von *Bacillus subtilis*

Herstellung des gebrauchsfertigen Testsystems

- 15 50 µl Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5, werden auf Filterpapierblättchen (Durchmesser 9 mm) gegeben. Die Testblättchen werden dann bei 40 °C getrocknet. Anschließend werden 50 µl einer 10^{-2} M-Lösung von p-Nitrophenyl- β -D-glucosid in Ethanol auf die
20 Testblättchen pipettiert und bei 40 °C trocknen gelassen. Auf die getrockneten Testblättchen gibt man 10 µl einer wässrigen Sporensuspension von *Bacillus subtilis* mit 10^7 Sporen/ml. Die Testblättchen werden anschließend erneut
25 bei 40 °C getrocknet und einzeln in 2-ml-Schraubglasröhrchen verpackt. Die gebrauchsfertigen Testblättchen werden bis zum Gebrauch bei 4 - 6 °C gelagert.

Durchführung des Hemmstofftests

Milchproben werden mit Chloramphenicol zu Konzentrationen von 32/16/8/4/2/1/0,5/0,25 µg/ml versetzt. Jeweils ein gebrauchsfertiges Testblättchen wird in die einzelnen

- 5 Milchproben eingetaucht und anschließend wieder in das Schraubglasröhrchen zurückgelegt. Nach 4 Stunden Bebrütung der dicht verschlossenen Schraubglasröhrchen bei 37 °C werden auf die einzelnen Testblättchen 20 µl 1 N Natronlauge gegeben.
- 10 Das Testblättchen ohne Chloramphenicol in der Milchprobe sowie diejenigen mit 0,25 bzw. 0,5 µg/ml zeigen eine intensive gelbe Farbe im Gegensatz zu den Testblättchen, die in Milchproben mit Chloramphenicol-Konzentrationen von 2 µg/ml und mehr eingetaucht wurden. Das Testblättchen
- 15 mit 1,0 µg/ml Chloramphenicol zeigt eine schwache Gelbfärbung.

Die Nachweisgrenze für Chloramphenicol beträgt somit unter den Testbedingungen 1 - 2 µg/ml.

Beispiel 3

- 20 Hemmstofftest unter Nachweis der Butyrat-Esterase von *Bacillus subtilis*.

Herstellung des gebrauchsfertigen Testsystems

- 25 50 µl einer MUELLER-HINTON-Bouillon in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,5, sowie 25 µl einer 2×10^{-2} M Lösung von 4-Methylumbelliferyl-butyrat in Aceton werden auf Filterpapierblättchen (Durchmesser 9 mm) gegeben. Die Testblättchen werden anschließend bei 40 °C in einem Warmluftstrom getrocknet.

Auf das getrocknete Testblättchen gibt man 10 µl einer wässrigen Sporensuspension von *Bacillus subtilis* mit 10^7 Sporen/ml. Die Testblättchen werden anschließend erneut bei 40 °C in einem Warmluftstrom getrocknet und bis zum
5 Gebrauch in einem 2-ml-Schraubglasröhrchen bei 4 - 6 °C aufbewahrt.

Durchführung des Hemmstofftests

Die Testblättchen werden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,5, mit verschiedenen Konzentrationen an Tetracyclin (16/8/4/2/
10 1/0,5/0,25/0,1/0,05/0,025/0,01 µg/ml) eingetaucht und anschließend wieder in das Schraubglasröhrchen zurückgelegt. Nach 4 Stunden Bebrütung der dicht verschlossenen Schraubglasröhrchen bei 37 °C wird die Fluoreszenz der
15 Testblättchen durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 366 nm untersucht.

Das Testblättchen ohne Tetracyclin in der Probe sowie diejenigen mit 0,01/0,25/0,05 µg/ml Tetracyclin in der Probe zeigen eine intensive blaue Fluoreszenz im Gegensatz zu den Testblättchen mit 0,1 µg/ml Tetracyclin in der Probe
20 bzw. höheren Tetracyclin-Konzentrationen. Die Nachweisgrenze für Tetracyclin beträgt somit unter den Testbedingungen 0,1 µg/ml.

Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung

6100 D a r m s t a d t

Patentansprüche

- 5 1. Mittel zum Nachweis von antimikrobiell wirksamen
Substanzen in einer Probe, bestehend aus Mikroorga-
nismensporen, einem Nährmedium, einem Indikator,
einem Puffersystem und gegebenenfalls einem Deter-
genz, dadurch gekennzeichnet, daß der Indikator ein
10 chromogenes oder fluorogenes Enzymsubstrat für Hy-
drolasen ist.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
das chromogene oder fluorogene Enzymsubstrat ein
Glycosid, ein Carbonsäureester oder ein Peptid-Deriv-
15 vat ist.
3. Mittel nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekenn-
zeichnet, daß es Sporen von Bacillus subtilis und
als chromogenes oder fluorogenes Substrat für Glyco-
sidasen ein β -D-Glucosid oder ein α -D-Glucosid
20 enthält.
4. Mittel nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekenn-
zeichnet, daß es Sporen von Bacillus stearothermo-
philus und als chromogenes oder fluorogenes Substrat
für Glycosidasen ein α -D-Glucosid oder ein α -D-Ga-
25 lactosid enthält.
5. Mittel nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekenn-
zeichnet, daß es Sporen von Bacillus subtilis und
als chromogenes oder fluorogenes Substrat für Amino-
peptidasen eine D-Alanin-(Chromophor/Fluorophor)-
30 Verbindung oder ein D-Alanin-(Chromophor/Fluoro-
phor) enthaltendes Peptid enthält.

6. Mittel nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es in getrockneter oder lyophilisierter Form vorliegt.
- 5 7. Mittel nach den Ansprüchen 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß es in einer polymeren Matrix vorliegt.
- 10 8. Verfahren zum Nachweis von antimikrobiell wirksamen Substanzen in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß man ein aus Mikroorganismensporen, einem Nährmedium, einem chromogenen oder fluorogenen Enzymsubstrat für Hydrolasen, einem Puffersystem und gegebenenfalls einem Detergenz bestehendes Testsystem mit der Probe vereinigt, inkubiert und das freigesetzte Chromophor oder Fluorophor visuell oder photometrisch bestimmt.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0174477

Nummer der Anmeldung

EP 85 10 9427

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE					
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)		
D,X	EP-A-0 091 837 (UNILEVER NV) * Seite 4, Zeile 2 - Seite 7, Absatz 5; Seiten 19-21, Beispiele 5,6 *	1-3,7,8	C 12 Q 1/18 C 12 Q 1/04 C 12 Q 1/34 C 12 Q 1/54		
Y	---	1,6,7			
D,Y	US-A-3 509 026 (R.G. SANDERS) * Spalten 1-4, ganzes Dokument *	1,6,7			
P,A	DE-A-3 327 839 (MERCK PATENT GMBH) * ganzes Dokument *	1,8			
D,A	EP-A-0 054 001 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) * Seiten 15-17, Beispiel 4 *	1,2,8	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)		
P,A	EP-A-0 122 148 (AJINOMOTO CO. INC.) * Seite 2, Zeile 5 - Seite 3, Zeile 6; Seite 13, Beispiel 1; Seite 14, Tabelle 1, Beispiel 5 *	1,2,4	C 12 Q 1/00		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.					
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 07-11-1985	Prüfer GREEN C.H.		
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument				